

本文引用:焦芳艳,尹铁球,黄露萍,李勇,谭宇蓉.2016-2018年临床分离铜绿假单胞菌的耐药情况分析[J].湖南中医药大学学报,2019,39(6):758-762.

2016-2018年临床分离铜绿假单胞菌的耐药情况分析

焦芳艳^{1,2},尹铁球²,黄露萍²,李勇²,谭宇蓉^{1*}

(1.中南大学湘雅基础医学院,湖南长沙410078;2.湖南省脑科医院,湖南长沙410007)

[摘要] **目的** 分析2016年至2018年湖南省脑科医院铜绿假单胞菌的临床分布情况、耐药情况以及耐药菌株I类整合子基因。**方法** 选取湖南省脑科医院2016年1月1日至2018年12月31日临床送检各类标本中分离出795株铜绿假单胞菌作为分析对象,就铜绿假单胞菌的临床分布情况以及耐药情况统计分析,2018年ICU分离的13株多重耐药菌株采用PCR扩增检测I类整合子。**结果** 铜绿假单胞菌分布科室主要为神经外科(24.53%),其次为呼吸内科(22.26%)和重症医学科(13.21%);铜绿假单胞菌对临床常用的20种抗生素耐药率和敏感率0-100%不等,多重耐药呈上升趋势;13株多重耐药菌株6株I类整合子阳性。**结论** 及时统计细菌分布情况、药物的耐药率、敏感率,并对其进行分析,可以为临床合理用药提供依据,有效预防和控制感染。

[关键词] 铜绿假单胞菌;抗菌药物;耐药率;敏感率

[中图分类号] R378.99+1

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2019.06.019

Analysis of Drug-resistance of Separated *Pseudomonas Aeruginosa* in Clinics in 2016-2018

JIAO Fangyan^{1,2}, YIN Tieqiu², HUANG Luping², LI Yong², TAN Yurong^{1*}

(1. Xiangya College of Basic Medicine of Central South University, Changsha, Hunan 410078 China;

2. Brain Hospital of Hunan Province, Changsha, Hunan 410007, China)

[Abstract] **Objective** To analyze the clinical distribution, drug-resistance and class I integron genes of drug-resistant strains of *pseudomonas aeruginosa* (PA) in the Brain Hospital of Hunan Province from 2016 to 2018. **Methods** A total of 795 PA separated from clinical specimens submitted for examination samples in the Brain Hospital of Hunan Province from January 1, 2016 to December 31, 2018 were regarded as analysis objects. The clinical distribution and drug-resistance of PA were statistically analyzed. In 2018, class I integron of 13 multiple drug-resistant strains separated from specimens submitted by ICU were detected by PCR amplification. **Results** Most of PA was from neurosurgery department (24.53%), followed by the department of respiratory medicine (22.26%) and the department of critical care medicine (13.21%). The drug-resistance rate and susceptibility rate of PA to 20 antibiotics commonly used in clinic ranged from 0-100%, with multiple drug-resistance on the rise. The class I integrons were detected positive in 6 of the 13 multiple drug-resistant strains. **Conclusion** Timely statistics and analysis of bacterial distribution, drug-resistance rate and susceptibility rate could provide the basis for rational drug use in clinics and effectively prevent and control infection.

[Keywords] *pseudomonas aeruginosa*; antibacterial drug; drug-resistance rate; susceptibility rate

铜绿假单胞菌(*pseudomonas aeruginosa*, PA)是假单胞菌属代表菌种,广泛分布于自然界、土壤、水体、空气以及人类皮肤、肠道、呼吸道等中,其属

于革兰阴性杆菌,是一种常见的条件致病菌,是医院感染的主要病原菌之一^[1]。近年来,由于抗生素不合理使用以至于PA成为临床病原菌的主要菌种之

[收稿日期] 2019-03-19

[基金项目] 湖南省卫生健康委计划项目(B2016026)。

[作者简介] 焦芳艳,女,主管检验师,在读硕士研究生,研究方向:微生物与免疫。

[通讯作者] * 谭宇蓉,女,博士,副教授,E-mail: yurong_tan@csu.edu.cn。

一。由于其易定植、易变异、多重耐药等特性^[2],导致PA感染已成为临床治疗的瓶颈^[3]。所以了解PA的临床感染的分布情况及药敏耐药、敏感特点十分重要,通过这些分析可以为临床合理用药提供依据,是加强医院感染控制的重要措施。

研究显示,PA的耐药机制较为复杂,其中包括群体感应系统、碳青霉烯酶、和外排泵等,近年研究也发现在整合子-基因盒系统中介导该菌由单一耐药向多重耐药发展过程时担任重要角色,我国多项研究表明基本为I类整合子^[4-6]。本研究分析总结了湖南省脑科医院2016-2018年临床分离的795株的临床耐药情况,并对2018年分离自ICU的13株多重耐药菌株的I类整合子进行了分析。

1 材料与方法

1.1 菌株来源及鉴定

选取2016年1月1日至2018年12月31日湖南省脑科医院患者临床分离到的(剔除重复标本)PA795株,质控菌株购自卫生部临床检验中心的PA ATCC27853、大肠埃希菌 ACTT25922,细菌分离按照《全国临床检验操作规程》第3版^[7]处理操作,采用全自动微生物鉴定仪进行细菌鉴定。

1.2 仪器与试剂

Vitek-2 Compact全自动微生物鉴定仪及配套试剂、TDR-300B plus天地人系统微生物鉴定仪及配套试剂,ABsteponplus基因扩增仪,柯达凝胶成像系统,BIO-RAD电泳仪。DNA提取试剂盒为OMEGA试剂盒。

1.3 药敏试验

药敏试验操作、结果判定采用CLSI2016-2018年版标准推荐的最低抑菌浓度(MIC)法。多重耐药铜绿假单胞菌(multiresistant pseudomonas aeruginosa, MRPA)的判定:对下面5类抗菌药中的3类及以上药物耐药包括头孢菌素类(如头孢吡肟)、氟喹诺酮类(如左旋氧氟沙星)、碳青霉稀类(如美罗培南)、B-内酰胺酶抑制剂(哌拉西林/他唑巴坦)和氨基糖苷类(妥布霉素)。

1.4 整合子基因扩增

按照OMEGA试剂盒说明书提取DNA,参考文献^[8]设计引物,引物int I 1-F和int I 1-R由湖南擎科生物技术有限公司合成,扩增条件为:95℃ 5 min;95℃ 20 s,52.5℃ 30 s,72℃ 1 min,35 cycle。PCR产物经琼脂糖凝胶电泳凝胶成像分析。

1.5 统计学方法

所有实验数据采用WHONET 5.6软件及SPSS

20.0软件进行分析。

2 结果

2.1 PA的分离情况

2016年1月1日至2018年12月31日3年临床共分离细菌6475株,株数及占比如下:三年共分离795株(795/6475,12.28%),2016年281株(281/2269,12.38%),2017年216株(216/1930,11.19%),2018年298株(298/2706,11.01%)。

2.2 PA在各临床标本中的分布情况

菌株主要来自住院患者的痰液78.49%(624/795)、伤口拭子6.04%(48/795)、支气管肺泡灌洗液4.78%(38/795)、尿液3.65%(29/795)、血液1.26%(10/795)、其他5.79%(46/795)等,见表1。

表1 PA在各临床标本中的分布(n,%)

标本种类	年份							
	2016		2017		2018		合计	
	株数	构成比	株数	构成比	株数	构成比	株数	构成比
痰液	218	77.58	171	79.17	235	78.86	624	78.49
伤口拭子	19	6.76	10	4.63	19	6.38	48	6.04
支气管肺泡灌洗液	15	5.34	10	4.63	13	4.36	38	4.78
尿液	8	2.85	9	4.17	12	4.03	29	3.65
血液	2	0.71	3	1.39	5	1.68	10	1.26
其他标本种类	19	6.76	13	6.02	14	4.70	46	5.79

注:其他标本种类包括胆汁、尿道拭子、无菌标本等

2.3 PA在各临床科室中的分布

本院由铜绿假单胞菌引起感染的临床科室较为多,几乎涉及所有科室,主要分布于神经外科、呼吸内科、重症医学科、神经内科、肿瘤科等等科室;主要科室株数及占比如下:神经外科分布24.53%(195/795)、呼吸内科22.26%(177/795)、重症医学科13.21%(105/795)、神经内科12.08%(96/795)、肿瘤科5.03%(40/795)、其他科室22.89%(182/795)等,具体见表2。

2.4 PA的季节分布

795例PA感染的季节分布,2016-2018年总体是秋季占比最高,冬季次之,见表3。

2.5 PA对临床常用抗菌药物的耐药性敏感性

从以下监测数据观察到,我院三年合计PA耐药高达96.81%,对哌拉西林/他唑巴坦、头孢他啶、哌拉西林保持相对较高敏感率,对亚胺培南和美罗培南较敏感在60%~70%左右。PA对头孢唑啉、氨苄西林、头孢呋辛、头孢曲松、头孢吡肟、氯霉素、氨苄西

表2 PA在各临床科室中的分布(n,%)

科室	年份							
	2016		2017		2018		合计	
	菌株	构成比	菌株	构成比	菌株	构成比	菌株	构成比
神经外科	62	22.06	52	24.07	81	27.18	195	24.53
呼吸内科	56	19.93	52	24.07	69	23.15	177	22.26
重症医学科	39	13.88	36	16.67	30	10.07	105	13.21
神经内科	44	15.66	27	12.50	25	8.39	96	12.08
肿瘤科	16	5.69	9	4.17	15	5.03	40	5.03
其他科室	64	22.78	40	18.52	78	26.17	182	22.89

注:其他科室包括内分泌科、骨科、消化内科、普外科、心胸科、肾内科、门诊等

表3 PA在2016至2018年的不同季节分布与构成比[n(%)]

季度	年份			
	2016	2017	2018	合计
春季(1-3月)	52(18.51)	35(16.20)	76(25.50)	163(20.50)
夏季(4-6月)	68(24.20)	30(13.89)	65(21.81)	163(20.50)
秋季(7-9月)	88(31.32)	74(34.26)	76(25.50)	238(29.94)
冬季(10-12月)	73(25.98)	77(35.65)	81(27.18)	231(29.06)

林舒巴坦耐药率高。具体数据见表4。

表4 2016-2018年PA对常用抗菌药物的耐药率和敏感率(%)

抗菌药物	年份							
	2016年		2017年		2018年		合计	
	R	S	R	S	R	S	R	S
氨苄西林	100	0	100	0	100	0	100	0
头孢唑林	100	0	100	0	100	0	100	0
氨苄西林/舒巴坦	99.46	0.54	98.52	0	91.56	4.55	96.61	1.69
哌拉西林	-	-	26.03	67.12	28.05	68.78	27.25	68.12
哌拉西林/他唑巴坦	16.04	63.39	17.37	70.89	23.41	70.63	19.07	68.23
头孢他啶	16.76	70.22	15.79	73.68	14.40	79.20	15.63	74.44
头孢曲松	99.44	0.56	53.24	2.16	63.25	22.89	73.97	8.61
庆大霉素	9.70	89.09	7.51	90.61	5.49	89.87	7.60	89.82
阿米卡星	2.03	97.97	3.27	95.33	2.31	96.92	2.50	96.81
头孢吡肟	10.95	78.54	10.23	81.86	8.08	79.62	9.70	79.92
左旋氧氟沙星	8.10	87.04	8.84	85.12	7.69	84.62	8.17	85.59
妥布霉素	8.90	89.47	6.43	90.00	7.89	88.16	7.99	89.42
环丙沙星	9.73	80.96	7.19	86.33	5.13	88.46	8.20	83.83
亚胺培南	31.20	62.75	23.57	56.43	28.21	59	28.40	60.21
美罗培南	-	-	21.23	73.97	20.49	71.72	20.77	72.56
氨基糖苷	-	-	14.67	66.67	32.22	60.00	27.06	61.96
头孢替坦	99.46	0	98.53	1.47	97.56	2.44	98.89	0.83
头孢呋辛	-	-	69.44	33.33	100	0	75.28	26.97
呋喃妥因	100	0	96.45	2.13	98.18	0.00	98.43	0.79
替加环素	-	-	0	100	0	100	0	100

注:-,未做检测,R.耐药率,S.敏感率

2.6 与本院2010-2012年PA抗菌药物耐药率统计分析

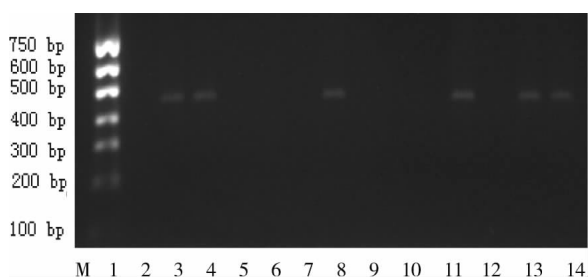
与本院文献^[8]2010-2012年合计统计分析,有11种抗菌药物的耐药率统计相同,其中有7种下降,2种上升,明显下降的有:庆大霉素、妥布霉素、环丙沙星、左旋氧氟沙星、阿米卡星、头孢吡肟,耐药率上升的有:头孢曲松、亚胺培南。

2.7 MRPA检出率分析

全院在795株PA分离中共分离出MRPA86株10.82%,MDPA在2016-2018年的检出率分别为6.54%(18/281)、10.9%(10.9/216)、14.77%(44/298),检出率呈上升趋势。

2.8 2018年分离自ICU的13株多重耐药菌株I类整合子分析

分析结果显示,6株阳性,产物大小约500bp(见图1),占46.2%,阳性率和文献报道相似^[5-6],表明整合子在铜绿假单胞菌的耐药性发展中起着重要的作用。



注: M. DNA 分子量标准; 1. 标准菌株 27853; 2-14. 多重耐药菌株

图 1 2018 年分离自 ICU 的 13 株多重耐药菌株 I 类整合子分析电泳图

3 讨论

3.1 PA 分布情况

PA 是医院内获得性感染常见的条件致病菌之一,可引起严重的肺炎、菌血症、烧伤后感染、泌尿系统感染等^[9],在目前医院感染中发挥重要作用^[10],且其感染率近年来不断增加^[11]。从结果 2.1 可以看出我院 PA 在总分离菌株中比例较高,3 年比例分布在 11.01%~12.38%之间,比湖南省 2017 年度细菌耐药监测报告发布的细菌耐药数据显示 PA 占总分离菌株比 8.03%,和 2016 年全国细菌耐药监测报告发布的数据显示 PA 在总分离菌株中约占 9.03%都高。所以,本院的患者 PA 总体感染相对严重,医院需对 PA 感染者更加严密监测和加强相关的研究,一定避免 PA 在院内大规模的爆发感染。但本院结果显示近三年来,检出率有逐渐下降趋势。说明近些年由于上级部门和医院开始重视,但各临床科室并不能掉以轻心。从表 2 看标本来源广泛种类多,但还是以痰标本最多且占比高。和近些年统计文献相同^[12-14]。此项显示,本室更应关注此类型标本及其菌的耐药情况,对其类型的标本进行进一步研究和总结,为临床提供更有价值的资料。从表 3 结果来看菌株科室分布前 5 名科室神经外科分布占 24.53%、呼吸内科 22.26%、重症医学科 13.21%、神经内科 12.08%、肿瘤科 5.03%,这可能是神经外科感染来源于患者基本手术及呼吸内科、神经内科患者多为老年病人,患者病程长、病情重、机体免疫力低下,在对重症科和肿瘤科患者进行抢救时常进行气管切开及插管等侵入性操作,同时这些患者常常伴有长时间的使用广谱抗菌药控制感染,容易引发机体菌群失调进而导致条件致病菌如铜绿假单胞菌感染增加。这与多文献研究^[15-17]基本相符。所以相关临床科室需要特别注意 PA 感染的患者,注意每次此菌感染患者的耐药情况分析,动态病情变化,选择更适合患者的

抗菌药物,尽量减少患者对此菌的多重耐药发生。从表 4 显示 2016-2018 年总体是秋季占比最高。这可能是秋天气候冷暖善变,昼夜温差较大,使得呼吸道抵抗力下降有关^[13]。这提醒临床对易感患者尤其注意这个季节需注意天气和昼夜温差变化,嘱咐患者保暖、加强营养,增强抵抗力,从而预防 PA 的感染。

3.2 PA 耐药分析

PA 具有多重耐药的特性,其耐药机制主要包括以下方面:(1)改变细胞膜和细胞壁结构,使其通透性下降,药物难以进入细胞内;(2)产生药物灭活酶如纯化酶、水解酶和修饰酶;(3)主动转运系统把抗生素排出;(4)产生 β -内酰胺酶使 β -内酰胺类抗生素开环失活;(5)改变药物作用的靶位,抑制细菌细胞壁生物合成,降低其与 β -内酰胺类抗生素的亲合性^[18]。表 4 数据显示 3 年中大多数药敏的敏感率耐药率相差不大,在 20 种抗菌药物中,合计敏感率高于 70%以上有 9 种,从高至低为:替加环素、阿米卡星、庆大霉素、妥布霉素、左旋氧氟沙星、环丙沙星、头孢吡肟、头孢他啶、美罗培南。合计敏感率在 69%~60%左右有 4 种,从高至低为:哌拉西林/他唑巴坦、哌拉西林、氨曲南、亚胺培南。合计药敏的耐药率高于 70%有 7 种以上从高至低为:氨苄西林、头孢唑林、头孢替坦、呋喃妥因、氨苄西林/舒巴坦、头孢呋辛、头孢曲松。从 3 年常规药敏变化来看:左旋氧氟沙星虽然敏感率较高但逐年略下降,美罗培南和氨曲南(16 年没做)敏感率也是下降。环丙沙星、头孢他啶敏感性逐年上升。从结果“2.6”显示,近些年由于管理部门及医院对抗生素重视管理、控制及监测,本院的铜绿假单胞菌耐药率呈明显下降趋势。从结果“2.7”来看比较近年其他文献^[19]统计 MRPA,本院多重耐药率较低,但是近三年持续上升,而且每年上升比例不少,所以临床要引起重视。根据以上统计分析,对于单纯铜绿假单胞菌感染的患者推荐临床根据病情使用敏感率高于 70%以上 9 种药,其中替加环素是目前极少见耐药的药物,可用作铜绿假单胞菌感染的患者最后一道防线的药物之一。而阿米卡星、庆大霉素、妥布霉素为敏感度较高可作为临床一线的抗菌药物。而环丙沙星、头孢他啶、头孢吡肟可以作为目前临床上较常规安全性选用的抗菌药物。对于左旋氧氟沙星在安全选用的同时持续关注。而对于敏感率在 69%~60%左右的 4 种及美罗培南来说,临床要慎重选用。尤其美罗培南、亚胺培南这类

碳青霉稀类药物,近年来耐药检测率越来越高,一旦其耐药可用抗菌药物就有限,临床尽量限制性选择,这与郭良等^[19]研究相符。当然,对临床来说尽量不用耐药率高于70%的7种药,而本院也需持续关注这7种耐药率高的药物,分析其耐药机制,为临床合理用药提供理论依据。对于复杂难治多种细菌感染,临床可以根据以上药敏药物敏感性联合搭配选药,慎用耐药率高的药敏药物。而对MRPA,临床更应高度重视其耐药危害性,根据本院提供抗菌药敏结果结合临床合理使用抗菌药物,防止或减慢多重耐药菌的产生。综上PA耐药分析,本院更应与临床加强沟通,更进一步总结分析与研究,为临床提供及时准确有效抗菌药物结果。

整合子是一种与耐药基因水平传播相关的可移动的基因元件,可以携带一个或多个耐药基因,在同种或不同种的细菌间发生水平传播,可导致多重耐药的发生^[20]。整合子根据其整合酶编码基因序列的不同分类,目前发现至少有6种,其中I类整合子最为常见^[21]。I类整合子在医院感染菌中广泛分布,而且由于抗菌药物在全球范围大量应用,也加速了I类整合子流行和播散^[4]。本研究初步表明,I类整合子在铜绿假单胞菌的耐药性发展中可能发挥重要作用,我们将进一步加大标本量进行各类整合子基因分析,并进一步结合基因测序技术对整合子可变区中耐药基因进行研究分析,从而更加明确铜绿假单胞菌耐药性机制。

3.3 小结

综上所述,铜绿假单胞菌致病性较强,临床分布广泛,是医院内感染的重要病原菌。近些年由于管理部门的重视,医院对药物关注和监测,对药物耐药机制关注与研究,常用抗菌药物敏感性会越来越多,耐药率呈下降趋势。但是我们更不能忽视依然还有许多药物耐药率及MRPA持续增高,应该继续更应严格管理抗菌药物,加强抗菌药物药敏检测,控制医院感染,有效预防和控制临床患者的PA感染,为临床合理有效使用抗菌药物提供科学依据。

参考文献

[1] 倪语星,尚红.临床微生物学检验[M].5版.北京:人民卫生出版社,2012:137.
[2] GHOLAMI S, TABATABAEI M, SOHRABI N. Comparison of biofilm formation and antibiotic resistance pattern of *Pseudomonas*

aeruginosa in human and environmental isolates[J]. *Microb Psthog*, 2017,109:94-98.
[3] 刘欢乐,陈舒影,吴小乐.耐亚胺培南铜绿假单胞菌的检出率与耐药性分析[J].中华医院感染学杂志,2016,26(2):265-267.
[4] 卢玲玲,潘晓微,潘晓夫.铜绿假单胞菌整合子介导耐药机制的初步研究[J].中国抗生素杂志,2014,39(6):462-465.
[5] 谷存国,周伟,王兴红,等.多重耐药铜绿假单胞菌I类整合子基因盒的检测与耐药机制研究[J].现代预防医学,2014,41(14):2601-2603.
[6] 杨明,钱扬会,赵强元,2013-2015年临床分离铜绿假单胞菌耐药性及I类整合子变化分析[J].国际检验医学杂志,2017,38(7):886-889.
[7] 中华人民共和国卫生部医政司.全国临床检验操作规程[M].南京:东南大学出版社,2006:770.
[8] 向万忠,任碧琼.铜绿假单胞菌的耐药性变迁及耐药机制[J].国际检验医学杂志,2013,34(10):1323-1324.
[9] KIM H S, PARK B K, KIM S K, et al. Clinical characteristics and outcomes of *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia in febrile neutropenic children and adolescents with the impact of antibiotic resistance: a retrospective study[J]. *BMC Infectious Diseases*, 2017,17(1):500.
[10] 辛力华,周昕,张爽,等.2008-2009年医院感染铜绿假单胞菌的耐药分析[J].中华医院感染学杂志,2012,7(22):1477-1479.
[11] 吴晓勇,史俊敏,伍贤鼎.385株铜绿假单胞菌临床分布与耐药性分析[J].检验医学与临床,2013,10(1):126-127.
[12] 张艳芳,冯广满.中山地区铜绿假单胞菌耐药性及亚胺培南耐药机制分析[J].南昌大学学报(医学版),2018,58(21):21-22.
[13] 陈约慧,应芙蓉,詹玲玲,等.1543株铜绿假单胞菌感染的临床分布与耐药性分析[J].中国临床药理学杂志,2016,34(24):2814-2817.
[14] 林丽容.铜绿假单胞菌分布及耐药情况分析[J].临床合理用药,2018,11(12):112-113.
[15] 黄兴富,范华.铜绿假单胞菌的临床分布及对环丙沙星耐药机制的研究[J].中国实验诊断学,2014,18(3):437-440.
[16] 方平安,熊域皎,鲍永强,等.836株铜绿假单胞菌的临床分布及耐药性分析[J].实用医院临床杂志,2018,15(5):201-204.
[17] 张泳,林丽英.住院患者铜绿假单胞菌感染分布、耐药状况及预后影响因素[J].检验医学与临床,2018,15(24):3786-3787.
[18] STOVER C K, PHAM X Q, ERWIN A L, et al. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen[J]. *Nature*, 2000,406(6799):959-964.
[19] 郭良,肖秀飞,左娟,等.多重耐药铜绿假单胞菌院内感染的耐药性研究[J].中外医疗,2017,31:185-187.
[20] 姜习新.多重耐药的铜绿假单胞菌I类整合子与其多重耐药基因的相关性分析[J].检验医学与临床,2012,9(3):300-302.
[21] GAUR A, PRAKASH P, ANUPURBA S, et al. Possible role of integrase gene polymerase chain reaction as an epidemiological marker: study of multidrug-resistant acinetobacter baumannii isolated from nosocomial infections[J]. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2007,29(4):446-450.